

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

CL

(11)Publication number : 06-256280

(43)Date of publication of application : 13.09.1994

---

(51)Int.Cl. C07C237/26  
A61K 31/65  
A61K 31/65  
A61K 31/65  
A61K 31/65

---

(21)Application number : 05-286864

(71)Applicant : UNIV NEW YORK STATE

(22)Date of filing : 16.11.1993

(72)Inventor : GOLUB LORNE M  
MCNAMARA THOMAS F  
RAMAMURTHY NANGAVARUM S

(30)Priority

Priority number : 92 977549 Priority date : 17.11.1992 Priority country : US

---

(54) TETRACYCLINE INCLUDING NON -ANTI-MICROBIAL CHEMICALLY -MODIFIED TETRACYCLINE  
INHIBITING EXCESSIVE COLLAGEN CROSSLINK DURING DIABETES

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain tetracycline contg. chemically modified analog thereof without antimicrobial efficiency which is useful for treatment of disorders related to excessive collagen crosslink, such as diabetes, scleroderma and progeria.

CONSTITUTION: Tetracycline is administrated to mammals in such an amount and/or a type not to be effective antimicrobially but to inhibit effectively excessive collagen crosslink, by which disorders of mammals related to crosslinking of excessive collagen. An administrated amount of non-antimicrobial tetracycline is within a range of 0.5-50.0 mg/kg, preferably 1.0-15.0 mg/kg. Preferable tetracyclines are those without dimethylamino group at 4-position, such as 4-dedimethylamino tetracycline, 4-dedimethylamino-5-oxytetracycline, etc. Further, there may be mentioned 6a-benzylthiomethylene tetracycline, 6-fluoro-6- demetyltetracycline etc.

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The above-mentioned method of being the treatment method of mammalian of having the obstacle which has relation in the crosslinking bond of the collagen of an excessive amount, and including medicating mammalian with the tetracycline of sufficient effective dose to check the crosslinking bond of the collagen of this excessive amount.

[Claim 2] A method in case relation is in the obstacle in which it is the method of a claim 1 and the crosslinking bond of the collagen of an excessive amount contains diabetes, a scleroderma, and a progeria in pathology.

[Claim 3] The way it is a method by the claim 1 and a tetracycline is a daisy methylamino tetracycline.

[Claim 4] It is a method by the claim 3. a daisy methylamino tetracycline 4-daisy methylamino tetracycline, A 4-daisy methylamino-5-oxytetracycline, a 4-daisy methylamino-7-chlorotetracycline, A 4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, 5a, a 6-anhydro-4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6alpha-deoxy-5-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6-Demeter-6-deoxy-4-daisy methylamino tetracycline, a 4-daisy methylamino-12a-deoxy tetracycline, and 4 - Method chosen from the group which consists of a daisy methylamino-11-hydroxy-12a-deoxy tetracycline.

[Claim 5] The method which is a method by the claim 1 and is chosen from the group which a tetracycline becomes from 2-NITORIRO analog of a 6a-benzyl thio methylene tetracycline and a tetracycline, the Monod N-alkylation amide of a tetracycline, a 6-fluoro-6-Demeter tetracycline, a 11a-chlorotetracycline, a 12a-deoxy tetracycline, and its derivative.

[Claim 6] The method by which it is a method by the claim 1, and a non-antibacterial tetracycline is prescribed for the patient in the amount of about 0.5mg/kg per day to about 50.0mg/kg per day.

[Claim 7] The method by which it is a method by the claim 6, and a non-antibacterial tetracycline is prescribed for the patient in the amount of about 1.0mg/kg per day to about 15.0mg/kg per day.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**


---

**[Detailed Description of the Invention]**
**[0001]**

[Industrial Application] this invention — national — odontology — R37 granted by research facilities It was made with governmental support under DE-03987. Although this invention is not effective in antibacterial, it relates to the treatment method of mammalian by medicating mammalian with the tetracycline of an amount effective in checking too much collagen crosslinking bond, and/or a mold of getting sick the obstacle which has relation in the collagen crosslinking bond of an excessive amount. In the obstacle which has relation in the collagen crosslinking bond of an excessive amount, they are diabetes and a scleroderma. (scleroderma) And a progeria (progeria) is contained.

**[0002]**

[Description of the Prior Art] intrinsic diabetes (diabetes) has required hundreds of millions of human beings — complicated — it is sick Diabetes has the feature in the rise of the glucose concentration in blood. A glucose cannot enter into a bodily cell to be used, but, so, exists by high concentration in blood. Blood-glucose concentration's excess of the resorption ability of an urethra pipe discharges a glucose in urine. Diabetes brings about the complication of a large number which are debilitated and exert risk on a life. Many abnormalities of the diabetes induction nature in collagen metabolism, such as collagenase activity excessive in pathology in gum and the skin, are reported to reference. Ramamurthy et al., J.Peridontal Res.17 : 455-462; (1983) Ramamurthy et al., Gerodontol.2(1) : 15-19 (1983). The complication of too much collagenase activity is usually intense \*\*\*\* destruction, and many relation is in diabetes. Finestone et al. and Diabetes 16: 336-340 (1967). This complication poses a problem, especially when illness cannot fully control. Ainamo et al., J. Clin.Peridontol.17 : 22-28 (1990).

[0003] The characteristic abnormalities of the collagen metabolism in a diabetic connective tissue are the extractabilities of a collagen or the soluble reduction in either cold (0-4 degrees C) neutral salting-in liquid or a dilute-acid solution. A soluble reduction of this collagen is reflecting too much crosslinking bond by the covalent bond of a collagen molecule, between \*\*, and an immanency molecule. A soluble reduction of the collagen of the diabetes induction nature by too much crosslinking bond of a collagen is seen in the various organizations containing the skin, a bone, a tendon, gum, and a main artery (it is limited to these and there is no end). Biochim.Biophys.Acta 534: Ramamurthy et al., Gerodontol.2: 1046; (1990) Dominiczak et al., Diabetes Care 13: 468; (1990) Golub et al., and 73 (1978). : 15; (1983) Brownlee et al. and Science 232: 1629; (1986) Buckingham et al., J.Clin.Invest.86 The unusual low solubility of a collagen is reflecting too much crosslinking bond of the collagen in the matrix outside a cell, and thereby, a collagen is polymerization-ized too much and comes (Biochim.Biophys.Acta 534: see Golub et al. and 73 (1978) as comment) to have resistance more to decomposition and metabolism.

[0004] Hamlin et al. (Diabetes 24: 902 (1975)) \*\* — "the aging resemblance (aging-like)" in collagen metabolism — a soluble reduction of this collagen and the increase in the crosslinking bond of a collagen by which a diabetic's connective tissue is characterized as unusual are indicated It is thought increasingly that this abnormality is the main causes of the immense complication of diabetes including the kidney obstacle containing the increase in the hardness of the skin, limitation of joint movement, the increase in the hardness of an arterial

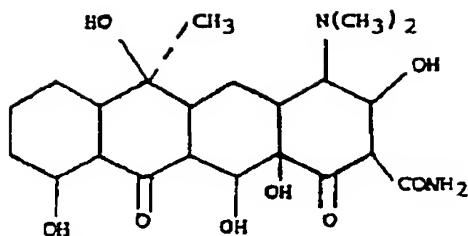
blood pipe, reduction of wound conglutination, reduction of the elasticity of lungs, and \*\*\*\*\* (it is limited to these and there is no end). It was proved that the crosslinking bond of the basement membrane (IV type collagen) of a kidney glomerulus makes the permeability over the protein of a basement membrane increase, and the albuminuria which is the classic parameter of the kidney obstacle in a diabetic is promoted next by the latest research (Walton et al., *Biochim.Biophys.Acta*, and 1138:172-183 (1992)). As it argued more before, intrinsic diabetes brings about the increase in the crosslinking bond of the protein containing a collagen. Cohen et al., (*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 95 : It found that the non-enzyme-glycosylation of a glomerular basement membrane increased 765-769(1980)) by the induction nature diabetes in a rat. Non-enzyme-glycosylation offers one mechanism for too much collagen crosslinking bond. Reiser, *Proc.Soc.Experiment.Biol.and Med.*, and 196:17-29 (1991). [0005] A collagen biosynthesis is a complicated process which has the feature in the ornamentation after an extension-translation. Jackson, *The Substrate Collagen*, Chapter 1, in: "Collagenase In Normal And Pathological Connective Tissues" (eds: D.E.Woolley and J.M.Evanson), pp 1-10, John Wiley & Sons Ltd., N.Y., and 1980. The crosslinking bond of a collagen is produced from two different biochemical paths, i.e., an enzyme-RIJIRU oxidase dependency crosslinking bond, and a non-enzyme-glucose origin collagen crosslinking bond. Buckingham et al., *J.Clin.Invest.* 86 : 1046 (1990). The hydroxylation of a fixed lysine and a proline residue and the enzyme agency glycosylation of a hydroxylysine are included in the event in the cell before a procollagen (collagen precursor) molecule is secreted from a cell. A C terminus and an amino terminus extension peptide are cut off in order. By the share crosslinking bond first mediated by the enzyme RIJIRU oxidase, a collagen molecule becomes stable in fiber alignment or a network structure. The non-enzyme-glycosylation of a fixed lysine and a hydroxylysine residue is also produced in the matrix outside a cell. This ornamentation seems to have direct influence on the structure and the function of a collagen with the indirect influence produced as a result of the next reaction of the glycosylated residue.

[0006] The increase in the collagen crosslinking bond in diabetes is mediated according to both mechanisms. That is, a crosslinking bond is mediated in non-enzyme according to the mechanism of the glucose origin by facing the rise of the liquid glucose concentration of an organization among blood in enzyme with too much activity of a RIJIRU oxidase. Makita et al., *New Engl.J.Med.* 325 : 836 (1991); Cerami et al. and *Diabetes Care* 11 (1988 (Suppl.1: 73)). An enzyme-RIJIRU oxidase dependency collagen crosslinking bond is started with the RIJIRU oxidase dependency oxidative deamination of a fixed lysine and a hydroxylysine residue. The aldehyde object to produce forms the crosslinking bond of a duplex, Mie, and 4-fold function through a lysine, a hydroxylysine and a histidine residue, and the further reaction. Robbins and *Methods Biochem.Analysis* 28: 330-379 (1982). Especially a RIJIRU oxidase converts epsilon-amino group of fixed RIJIRU in the non-spiral field of a collagen molecule, and a hydroxy RIJIRU residue into an aldehyde object, and this aldehyde object forms the molecule and Schiff-base crosslinking bond of \*\*\*\*. Vader, et al., *Biochem.J.* 180 : 639-645 (1979).

[0007] As described above, a non-enzyme-glucose origin crosslinking bond is started with the non-enzyme-glycosylation of the lysine on the collagen molecule in the matrix outside a cell, and a hydroxylysine residue. It is thought that these early glycosylation products form the complicated fluoro forehead and KUROMO forehead who are named an advance Maillard (Maillard) product or an advance glycosylation end product (AGES) generically through a series of reactions. Brownlee et al., *N.Engl.J.Med.* 318 : 1315-1322 (1988). Brownlee et al. (*Science* 232:1629-1632 (1986)), The aminoguanidine has reported that it is the effective inhibitor of the non-enzyme-glucose origin collagen crosslinking bond which has relation in the diabetes of a rat. However, the use to a man is not approved for the aminoguanidine. On the other hand, as for the tetracycline, the use to a man is approved.

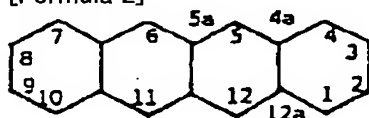
[0008] A compound tetracycline has the following general structure expression.

[Formula 1]



[0009] The number of the atom which constitutes a ring is as follows.

[Formula 2]



[0010] A tetracycline exists naturally like a 5-OH derivative (Terramycin) and a 7-Cl derivative (aureomycin), and is well known as an antibiotic. Although the atom in structure with a fixed natural tetracycline must be held, ornamentation can be received without losing an antibiotic property. It is related with possible ornamentation and impossible ornamentation to the structure of the tetracycline used as the foundation, and they are The Chemistry of Tetracyclines, Chapter 6, Marcel Dekker, Publishers, and N.Y. (1978). It sets and is discussed by Mitscher. According to Mitscher, even if the substituent of the 5-9th place of a tetracycline ring structure is embellished, it does not necessarily disappear an antibiotic property completely. However, if there is substitution of the substituent of the change to the ring structure used as the foundation or the 1-4th place, and the 10-12th place, generally the synthetic tetracycline which does not have antimicrobial activity effective again by substantial more few antimicrobial activity will be obtained. For example, it is considered that 4-daisy methylamino tetracycline is usually a non-antibacterial tetracycline.

[0011] While use of a tetracycline antibiotic is effective, it may bring about the side effect which is not desirable. For example, when an antibiotic tetracycline is prescribed for the patient for a long period of time, a healthy parasite like an intestines parasite may be decreased or decayed, and production of an antibiotic resistance bacillus, the yeast of opportunistic, and superfluous growth of a fungus may be induced. In addition to these antibiotic properties, the tetracycline is indicated about many usages. For example, it is also known that a tetracycline will check the activity of a mammalian collagenase, a gelatinase, a macrophage elastase, and a collagen resolvability enzyme like a bacterial collagenase. Golub et al., J.Periodont.Res.20 : 12-23; (1985) Golub et al.Crit.Revs.Oral Biol.Med.2 : 297-322 (1991).

[0012] A tetracycline is :U.S. Pat. No. 4,666,897 by which playing the role which decreases the activity of a collagenase and other collagen resolvability enzymes like decomposition of a collagen even if a medicine is prescribed for the patient by which of the antibacterial-like level and non-antibacterial level is known, No. 4,704,383, No. 4,935,411, and No. 4,935,412. Furthermore, a tetracycline is :U.S. Pat. No. 5,045,538 by which checking debility of mammalian skeletal muscle and proteinic disassembly is known. Furthermore, a tetracycline is :U.S. Pat. No. 4,925,833 it was proved to be to promote bony formation in osteoporosis. McNamara et al. It is indicated by U.S. Pat. No. 4,704,383 that the tetracycline which does not have effective antimicrobial activity substantially checks the activity of the collagen resolvability enzyme in a rat. McNamara et al. It has also reported that a non-antibacterial tetracycline decreases osteoclasts in an organ culture. Before, decreasing decomposition of the connective tissue containing what the general tetracycline which contains the medicine of the available antibacterial-like gestalt in U.S. Pat. No. 4,666,897 to Golub et al. commercially checks too much activity of the collagen resolvability enzyme of mammalian, consequently is produced in osteoclasts is indicated.

[0013] A large number [ the proposal that the tetracycline containing a non-antibacterial

tetracycline is effective in the treatment of the arthritis of a rat ]. For example The following Reference : Golub et al. and "Tetracyclines (TCs) Inhibit Matrix Metalloproteinases(MMPs):In Vivo Effects in Arthritic and Diabetic Rats And New In Vitro Studies and" Matrix and Suppl.No.1 : 315-316; (1992) Greenwald et al."CMT, A MatrixMetalloproteinase Inhibitor, and Prevents Bone Resorption In Adjuvant Arthritis." Arthritis Rheum.: 34 (#9 suppl) : S66 (abstract #A6), abstract presented at 55th Annual Meeting, Amer.College of Rheumatology, Boston MA, November 18, 1991; Breedveld and "Suppression of Collagen And AdjuvantArthritis By A Tetracycline," Northeastern Regional Meeting ofThe Amer.Rheum.Assoc., Atlantic City, New Jersey, October 23, 1987. As related reference about the influence of the non-antibacterial tetracycline exerted on bony loss \*\*Sipos et al. and "The Effect of Collagenase Inhibitors On Alveolar BoneLoss Due ToPeriodontal Disease \*\* [ In Desalivated Rats, "abstract presentedat Matrix Metalloproteinase Conference, Destin, Florida, and 11-September 15, 1989 were referred to ].

[0014] White, Lancet, April 29, and p.966 (1989) If it depends, it is effective in the medical treatment of the dystrophy nature epidermolysis bullosa which is the skin obstacle which has risk in the life considered that a tetracycline MINOSAI curine has relation in too much collagenase. The effectiveness of the tetracycline in a skin obstacle is Elewski et al. and Journal of the American Academy of Dermatology 8. : 807-812 (1983) It inquires. It is being surmised that a part of curative effect in the skin disease to which Elewski et al. indicates that a tetracycline antibiotic has anti-inflammation activity in the skin, and relation is in bacteria like an acne will be what is depended on prevention of bacteria induction nature inflammation rather than the direct antibacterial-like effect. Similarly, they are Plewig et al. and Journal of Investigative Dermatology 65. : 352-532 (1975) is indicating the experiment designed in order to confirm the hypothesis that an antimicrobial is effective in the medical treatment of an inflammation sex-skin skin disease. Plewig et al. Having an anti-inflammation-property in the medical treatment of the pustule induced when a tetracycline stretches and applied potassium iodide by experiment is confirmed.

[0015] In the medical treatment of the inflammation sex-skin skin disease from which a simple nature acne lengthens owing to, and happens, using a tetracycline in combination with a non steroid anti-inflammatory agent is studied. Wonget al. and Journal of American Academy of Dermatology 11: 1076-1081 (1984) The combination of a tetracycline and ibuprofen was studied, and while the tetracycline was effective to the simple nature acne, ibuprofen found the useful thing, although the inflammation produced by prevention of a cyclooxygenase is mitigated. Funt and Journal of the American Academy of Dermatology 13: 524-525 (1985) \*\*\*\* -- the same result depended on combining the MINOSAI curine and ibuprofen of antibacterial dosage is indicated Based on the above, it turns out in different medical treatment that a tetracycline is effective. However, the proposal that the indication and the symptom of a collagen crosslinking bond with too much tetracycline are improvable does not exist at all. Furthermore, it turns out that a tetracycline does not have significant influence on diabetes to mitigation of the severity of a hyperglycemia with relation. Golub et al., J.Periodontal Res., 18:516-526;(1983) Golub et al., Res.Communic.Chem.Path.Pharmacol., 68 : 27-40 (1990); Yu et al. and J.Periodontal Res., Presentation for issue (1992).

[0016] On the other hand, unlike a tetracycline, the insulin is useful for the medical treatment of a diabetic symptom including mitigation of the severity of a hyperglycemia. However, most diabetics who received the medical treatment of an insulin have a certain amount of hyperglycemia which finally still draws too much collagen crosslinking bond. It is not clear whether it is an enzyme-R1JIRU oxidase dependency collagen crosslinking bond, whether the main causes of too much collagen crosslinking bond produced from a hyperglycemia are non-enzyme-glucose origin collagen crosslinking bonds, and which mechanism it is.

[0017]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It means that this invention offers the means for treating too much collagen crosslinking bond. Having a use new [ the tetracycline which contains the analog which lost an antibacterial effect, and by which chemical modification was carried out by this invention ], and new is proved, and having the capacity which checks too

much collagen crosslinking bond in a diabetic connective tissue is proved. This antibacterial property of a tetracycline mitigates the heavy complication of diabetes including the improvement of the albuminuria which is the indication of diabetes induction nature nephropathy (disorder complication which has risk in a life). this invention offers the treatment method of mammalian of getting sick the superfluous collagen crosslinking bond which has relation in diabetes, a scleroderma, and a progeria. Although the method of this invention is not effective in antibacterial, it includes medicating mammalian with the tetracycline of the amount which checks a superfluous collagen crosslinking bond effectively, and/or a mold. For example, a tetracycline like a daisy methylamino tetracycline which carried out chemical modification is useful in this invention. To a daisy methylamino tetracycline, 4-daisy methylamino tetracycline, A 4-daisy methylamino-5-oxytetracycline, a 4-daisy methylamino-7-chlorotetracycline, A 4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, 5a, a 6-anhydro-4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6alpha-deoxy-5-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6-Demeter-6-deoxy-4-daisy methylamino tetracycline, a 4-daisy methylamino-12a-deoxy tetracycline, and 4 - A daisy methylamino-11-hydroxy-12a-deoxy tetracycline is contained.

[0018] Furthermore in this invention, 2-NITORIRO analog of a 6a-benzyl thio methylene tetracycline and a tetracycline, the Monod N-alkylation amide of a tetracycline, a 6-fluoro-6-Demeter tetracycline, a 11a-chlorotetracycline, a 12a-deoxy tetracycline, and its derivative exist as an example of the useful tetracycline which carried out chemical modification. a non-antibacterial tetracycline — the amount kg of about 0.5mg/kg per day to about 50.0mg /per day — a medicine is preferably prescribed for the patient in the amount kg of about 1.0mg/kg per day to about 15.0mg /per day The method of this invention improves the increase in the hardness of the skin, reduction of the elasticity of lungs, the increase in the hardness of an arterial blood pipe, limitation of joint movement, reduction of wound conglutination, and many complications that have relation in diabetes, such as nephropathy which brings about albuminuria. For a better understanding of this invention, reference is made with a drawing to the following description, and the range of this invention is shown in the appended claim.

[0019]

[Means for Solving the Problem] It was found that a tetracycline checks too much collagen crosslinking bond which has relation in diabetes, a scleroderma, and a progeria. Especially artificers found that use of a fixed tetracycline checked the crosslinking bond of too much collagen. It was shown that various tetracyclines affect blood-glucose concentration. The tetracycline of this invention proved the anti-collagen crosslinking bond effect clearly. The tetracycline of this invention is combinable with the insulin treatment by which changing blood-glucose concentration in diabetic treatment is known. An insulin measures regulation of a hyperglycemia to a tetracycline checking too much collagen crosslinking bond. As stated previously, the nephropathy which brings about reduction and albuminuria of the increase in the hardness of the skin, reduction of the elasticity of lungs, the increase in the hardness of an arterial blood pipe, limitation of joint movement, and wound conglutination is contained in the complication of the diabetes which has relation in too much collagen crosslinking bond.

[0020] The effect and relation whose tetracycline of decreasing does not expect glycosylation of protein have the effect of prevention of too much collagen crosslinking bond. Although it does not desire to be bound to any one theory, it is thought that this prevention effect over a collagen crosslinking bond excessive in pathology decreases a non-enzyme-glucose origin collagen crosslinking bond, and relation has it in the capacity which the tetracycline of also decreasing an enzyme-RIJIRU oxidase dependency collagen crosslinking bond does not expect. The obstacle treated by this invention is produced in mammalian. A laboratory animal like Homo sapiens, a mouse, and a rat is contained in mammalian. In this invention, useful tetracyclines are arbitrary tetracyclines with which mammalian is medicated in mammalian with the dosage which is non-antibacterial-like as a matter of fact. Preferably, a tetracycline receives ornamentation so that an antibacterial property may be decreased. The method of decreasing the antibacterial property of a tetracycline is indicated by 211 pages of "The Chemistry of the Tetracyclines", Chapter 6, Mitscher, Marcel Dekker, Publishers, and N.Y.

(1978). 1, 2, 3, 4, 10, and the ornamentation in 12a place bring about loss of biological activity as pointed out by Mitscher. The thing with a desirable non-antibacterial tetracycline is because it can be used with the level for treatment which brings about a side effect fewer than an antibacterial tetracycline in the same dosage.

[0021] A desirable tetracycline lacks the dimethylamino machine of the 4th place. To such a tetracycline by which chemical modification was carried out, for example, 4-daisy methylamino tetracycline, A 4-daisy methylamino-5-oxytetracycline, a 4-daisy methylamino-7-chlorotetracycline, A 4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, 5a, a 6-anhydro-4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6-Demeter-6-deoxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6alpha-deoxy-5-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, 4 - A daisy methylamino-11-hydroxy-12a-deoxy tetracycline, a 4-daisy methylamino-12a-deoxy tetracycline, and its derivative are contained. For example, in order to make nitril like tetrapod SAIKURINO nitril, the tetracycline which received change with the carbon of the 2nd place is useful as a non-antimicrobial agent in which an anti-collagen crosslinking bond property is shown, when a medicine is prescribed for the patient in a parenteral path.

[0022] The Monod N-alkylation amide of a 6a-benzyl thio methylene tetracycline and a tetracycline, a 6-fluoro-6-Demeter tetracycline, a 11a-chlorotetracycline, a 12a-deoxy tetracycline, and its derivative are contained in the further example of the tetracycline embellished for reduction in antimicrobial activity. While the effective dose of a tetracycline is an amount which checks too much collagen crosslinking bond effectively, it is an amount which is not effective in antibacterial. If a tetracycline exists in the amount which decreases too much collagen crosslinking bond intentionally, too much collagen crosslinking bond will be effectively checked as the purpose of this invention. Too much collagen crosslinking bond is defined as the crosslinking bond of a larger collagen than what is seen in a connective tissue symmetrical with the non-diabetes of age in the same year (Diabetes24: Hamlin et al., 902 referring-to-(1975) ).

[0023] It is considered that a tetracycline is non-antibacterial-like as a matter of fact if a microbiological growth is not checked intentionally. Of course, this changes depending on the factor of a large number, such as a mold of the mold of a tetracycline, a sick state, and a microorganism. The maximum effective dosage for men means the peak in the inside of the dosage which does not cause a detrimental side effect. For example, in the case of the purpose of this invention, significant antimicrobial activity is clinically contained in a side effect as well as a toxic effect. The dosage beyond an abbreviation 50mg/kg/day brings about a side effect in the mammalian of most including a man. the non-antibacterial tetracycline of this invention — about 0.5 — a mg/kg/day to about 50.0 — a mg/kg/day — desirable — about 1.0 — a mg/kg/day to about 15.0 — a medicine will be prescribed for the patient in a mg/kg/day amount The means of combination of pharmacologically permissible support and a tetracycline has the various forms containing a capsule, a compression tablet, a pill, a solution, or suspension. It is thought that the suitable support for taking orally or partial medication by pouring and other selection meanses is contained.

[0024]

[Example] Although it is useful to the following examples giving the further understanding of invention, restricting the scope of invention in any points is not meant.

Example The mature male Sprague-Dawley rat of 124 animals was measured (weight (350-375g)), and the same solution containing the streptozotocin (75g [ per weight of 1kg ] streptozotocin) for inducing brine (non-diabetes symmetry, NDC) or diabetes 0.9% was poured in through the end vein. The diabetes rat was distributed to five experimental groups (per [ n= 4 ] group), and 0, 1, 2 and 5 which were suspended in 2% carboxymethyl cellulose (CMC), or CMT-1 [ 10mg ] (4-daisy methylamino tetracycline, non-antibacterial tetracycline which carried out chemical modification) were prescribed for the patient with the oral nutrition every day during 21 days, respectively. The non-diabetes symmetrical rat carried out a diet only of the support (2%CMC). The glucose concentration in urine is Tes-Tape (Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN). It measured every week.

[0025] The rat was measured on the 21st, anesthesia was applied by halo SEIN (Halocarbon



Laboratories), and the blood sample was extracted for a blood serum glucose (a sigma glucose oxidase kit, St.Louis, MO) and measurement of CMT-1. And a rat is killed by bleeding, the skin from the whole drum is torn apart and measured, and they are Schneir et al. and Diabetes 31:426 (1982). It subdivided as the publication. Technology mentioned above (Biochim.Biophys.Acta 534: Golub et al., J.Periodont.Res.12: 402 (1977), Golub et al., and 73 (1978)) The skin sample was investigated about collagen solubility by using it, adding some corrections. Except for the part with directions, all processings were performed at 4 degrees C. When said simply, for manufacture of a neutral-salt-fusibility collagen, the tris hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.4) extracted the skin of the subdivided rat for two days, and the at-long-intervals heart was carried out by 11,000xg for 20 minutes. Precipitation was extracted for further 18 hours and carried out centrifugal like the above. Next, both supernatant liquids were mixed and it dialyzed completely for two days to the acetic acid 3%.

[0026] For manufacture of an acid-fusibility collagen, the acetic acid extracted sedimentation 3% like the publication further for neutral-salt extraction. The neutral salt and the dilute-acid extract were dried at 60 degrees C under reduced pressure with the rotating type evaporation dryer. A vacuum drying is carried out, as distilled water is heated for 15 minutes at 121 degrees C under a pressure in addition to the pellet which remains and being mentioned above for manufacture of an insoluble collagen. After acidolysis, while using it for measurement of the dried sample from two extracts of the collagen of neutral-salt - and acid-fusibility, the amount of an insoluble collagen was determined using sedimentation. Extraction and the measurement by HPLC of CMT-1 concentration in a rat blood serum are Yu et al. and Biochem.Med.& Metabolic Biol.47:10-20 (1992). It went as indicated. Statistics analysis was performed about data. The standard deviation of the mean (S. E.M) was calculated from standard deviation. While analysis of distribution of the statistical significance between groups determined, the significance of the difference between groups is Tukey. The examination determined.

[0027] Result drawing 1 expresses the influence of [ at the time of changing the oral dosage of CMT-1 to the blood-glucose concentration (mg/dl) of a streptozotocin-diabetes rat ] with a graph. Each value expresses average\*\*S.E.M. about the rat of four per experimental group. As shown in drawing 1, the rat became a hyperglycemia remarkably for three weeks after induction of the diabetes by the streptozotocin. The non-diabetes symmetry (NDC group) and unsettled diabetes (UD group) showed blood-glucose concentration called 95 mg/dl\*\*3 (S. E.M) and 787 mg/dl\*\*10, respectively ( $p < 0.01$ ). Even if it treated the diabetes rat by CMT-1 of the oral dosage from which the range of 1-10mg/day differs, severity of a hyperglycemia was not changed intentionally ( $p > 0.05$ ). Blood serum CMT-1 concentration is Yu et al. and Biochem.Med.& Metabolic Biol.47. : 10-20 (1992) It analyzed using the HPLC technology indicated. If the dosage of the medicine which carries out internal use to a diabetes rat is made to increase, the result will prove that the blood serum concentration of each rat increases from 0.6microg (in the case of 1mg oral dosage)/ml to 6.5microg (in the case of 10mg oral dosage)/ml (data are not shown.). Table 1 is increasing [ blood serum CMT-1 concentration of a different experimental group ]-from the 0.75microg [/ml ] average to 5.8microg (in case of 10mg oral dosage)/ml (when it is 1mg oral dosage) \*\*\*\*.

[0028]

Table 1 Result ----- of blood serum CMT-1 concentration at the time of making the dosage of CMT-1 to a streptozotocin-diabetes rat increase, and carrying out internal use Experimental group Blood serum CMT-concentration (mug/ml)

NDC 0**0	UD 0**0	D+1mg CMT/day	0.75**0.04
D+2mg CMT/day	1.75**0.05	D+5mg CMT/day	3.90**0.16
D+10mg CMT/day	5.80**0.25		

----- each value expresses average\*\*S.E.M. of the rat of four per group.

[0029] Drawing 2 expresses the influence of CMT-1 treatment to the acid meltable fraction of the collagen in the skin of a diabetes rat with a graph. The solubility of the collagen in a dilute

acid (4 degrees C) is standardized so that a non-diabetes control (NDC) rat may become 100%, and the result of unsettled diabetes (UD) and CMT-1 processing diabetes (D+mgs CMT-1) is expressed by the relativity to a NDC value. \* A value shows that it differs intentionally [ NDC ]. ( $p<0.01$ )

Drawing 3 expresses the influence of CMT-1 medical treatment to the salt meltable fraction of the collagen in the skin of a diabetes rat with a graph. The solubility of the collagen in a neutral salt (4 degrees C) is standardized so that a non-diabetes control (NDC) rat may become 100%, and the result of unsettled diabetes (UD) and CMT-1 processing diabetes (D+mgs CMT-1) is expressed by the relativity to a NDC value. \* A value shows that it differs intentionally [ NDC ]. ( $p<0.01$ )

The data shown in drawing 2 and drawing 3 show the influence of the diabetes to the solubility of a skin collagen, and the oral dosage of CMT-1 of an increase in the dilute acid (4 degrees C) and neutral salting-in liquid which were cooled, respectively. The case of both NDC and a diabetes rat of most collagens (92 - 96%) under organization was insoluble in the solution of these as expected (data are not shown). When diabetes was induced, the solubility of the skin collagen in neutral salting-in liquid and a dilute-acid solution reached 52%, respectively, and decreased 56% ( $p<0.01$ ). You should notice the soluble data of a collagen about the case of the salt-fusibility of the skin of a non-diabetes symmetrical rat and an acid-fusibility fraction being standardized to 100%. When the amount of internal use of CMT-1 with which a diabetes rat is medicated was made to increase continuously, the solubility of the unusually low collagen in neutral salting-in liquid increased to 91% (in the case of the dosage of 10mgCMT/a day) from 10% (in the case of the dosage of 1mgCMT/a day), and the low solubility of the collagen in a dilute-acid solution increased from 18% (dosage of 1mg/day) to 115% (dosage of 10mg). However, only when a diabetes rat was medicated with 5 and CMT-1 of the maximum oral dosage of 10mg/day, the value of collagen solubility near the normal value seen in a non-diabetes symmetrical rat was acquired ( drawing 2 and drawing 3 ).

[0030] CMT-1 cure normalized the property of the collagen in the skin of a diabetic animal by checking too much crosslinking bond by which the collagen in a diabetes connective tissue is characterized. The same influence was seen, when [ which carried out internal use of the available antibacterial tetracycline commercially ] being called a MINOSAI curine (CMT-1 and 4-daisy methylamino tetracycline is the analog of a tetracycline which lost antibacterial effectiveness) by the diabetes rat, as shown in Table 2. As mentioned above, most collagens in the skin of a normal rat were insoluble in neutral salting-in liquid and the dilute-acid solution (4 degrees C). That is, only 5.8% and 10.7% of the collagen of the skin have dissolved in NaCl which is 1M, respectively, and 3% acetic acid. When a rat was made into diabetes, especially the solubility of a collagen decreased in the dilute-acid solution ( $p<0.05$ ), and the relative amount of the insoluble collagen of the skin rose from the normal level of 83.5% to the unusually high level of 88.8% in diabetes ( $p<0.05$ ). However, when diabetes was treated by the MINOSAI curine, the solubility of a collagen returned to the normal level.

[0031]

Table 2 Solubility of the skin collagen in the neutral salting-in liquid in a diabetes rat, and a dilute-acid solution (4 degrees C) : influence ----- of internal use of MINOSAI curine (Mino) Experimental group Collagen fraction (%)

Salt - Meltable	Acid - Meltable	Insoluble	NDC
5.8**0.3	10.7**1.9	83.5**1.6	UD 4.5**0.6 6.7**0.2# 88.8**0.5# D+20mg 5.8**1.3 12.2**1.9
82.0**3.2	Mino/day		each value expresses

average\*\*S.E.M. of the rat of three per group.

# others -- it differs from two groups intentionally ( $p<0.05$ )

[0032] Three groups of a rat called an example 2 non-diabetes symmetric group, an unsettled streptozotocin-induced-diabetes group, and the streptozotocin-induced-diabetes group processed in taking orally by deoxy SAIKURIN of 2mg / rat / day over 14 weeks were established. The blood sample was collected from each rat, by the keto amine crosslinking bond, it combined with protein in non-enzyme, and the glycosylation protein of a blood serum was measured in the end of 14 weeks using the analytical method based on the property of

the glucose of forming fructosamine. During analysis, when the tetrazolium decreases under alkaline conditions by keto amine combination, change of a color arises and this is measured in spectrophotometry. Armbruster, Clin.Chem., 33 : 2153-2163 (1987). The fructosamine analysis kit is available from Isolab Inc., Akron, and Ohio 44321. Centrifugal [ of especially the blood serum sample ] was carried out, and it removed the lipid. The substrate which processes a transparent blood serum sample with a reagent, and serves as an ascorbic acid and other hindrance was removed. And the processed blood serum sample was incubated with the fructosamine-beaker RUBONETO reagent (tetrazolium salt). The reaction was stopped by addition of HCl and absorption on the wavelength of 500nm was measured with the spectrophotometer. Data were analyzed statistically.

[0033] As shown in the result table 3, the fructosamine concentration in blood serum protein increased intentionally ( $p < 0.01$ ) by chronic diabetes (14 weeks of durations), and the chronic hyperglycemia. These results offer the proof of the non-enzyme-glycosylation which is the reaction widely considered to be the main causes including a collagen crosslinking bond excessive in pathology of many diabetic medical complications over a long period of time. Further, Table 3 shows that the fructosamine concentration in diabetic blood serum protein decreased intentionally ( $p < 0.05$ ), when diabetes is treated by the doxycycline every day. It is suggested that medication of a tetracycline (for example, doxycycline) prevents the non-enzyme-glycosylation of the protein in chronic diabetes from these results. However, the degree of onset of the hyperglycemia of a diabetes rat is not eased by these treatment, either. Golub et al., Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol., and 68:27-40 (1990).

[0034]

Table 3 Experimental group of a rat Blood serum fructosamine concentration (average \*\* standard deviation)

	Non-diabetes symmetry	1.33**0.05 Unsettled
diabetes	3.82**0.17	Doxycycline processing diabetes 3.23**0.20

[0035] The example 3 was performed in order to determine the influence of the tetracycline treatment to the albuminuria which is the parameter of nephropathy in an example 3 diabetes rat. Over four weeks, internal use of the minocycline of 20mg / rat / day was carried out every day, and the streptozotocin-diabetes rat was processed. When processing was completed, the urine for 24 hour was collected and the proteinic amount of excretion was measured.

[0036] a result — drawing 4 — having been shown — as — the inside of urine — the proteinic amount of excretion increased 483% from 48mg / 24 hours in a normal (non-diabetes) rat to 280mg / 24 hours in an unsettled diabetes rat Surprising generating of the albuminuria in a diabetes rat if internal use of the minocycline is carried out especially every day was barred completely. According to Walton et al., Biochim.Biophys.Acta, and 1138:172-183 (1992), disturbance of this albuminuria will prove further the property of the tetracycline of this invention of checking too much collagen crosslinking bond. The latest experiment which uses the non-antibacterial tetracycline (CMT-1;4-daisy methylamino tetracycline) which carried out chemical modification also showed that the albuminuria in a diabetes rat decreased (data are not shown). Golub et al., Matrix, and suppl 31: 315-316 (1992). Drawing 4 shows that the amount of excretion of the quality of an urine protein became in 52mg / 24 hours by processing of the minocycline. By neither of the minocycline and CMT-1 of the processings, other signs of the diabetes containing a hyperglycemia, a glycosuria, and the polyuria decreased.

[0037] The powerful and new medical key for barring the aging accelerated clearly and too much unusual collagen crosslinking bond widely considered that many of diabetic heavy complications have relation from these experimental results that use the tetracycline of both antibacterial type and non-antibacterial types is shown. Thus, although here indicated what is considered to be the desirable concrete mode of invention now, without separating from the pneuma of this invention, he is others and it will be understood by this contractor that it is possible to make the further correction. this invention is meant with a thing including all corrections that enter within the limits of the truth of invention stated to the claim.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 expresses the influence of [ at the time of changing the oral dosage of CMT-1 to the blood-glucose concentration (mg/dl) of a streptozotocin-induced-diabete rat ] with a graph.

[Drawing 2] Drawing 2 expresses the influence of CMT-1 treatment to the acid meltable fraction of the collagen in the skin of a diabetes rat with a graph.

[Drawing 3] Drawing 3 expresses the influence of CMT-1 treatment to the salt meltable fraction of the collagen in the skin of a diabetes rat with a graph.

[Drawing 4] Drawing 4 expresses the influence of the minocycline treatment to the amount of urine excretion and albuminuria of a diabetes rat with a graph.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## CORRECTION or AMENDMENT

[Official Gazette Type] Printing of amendment by the convention of 2 of Article 17 of patent law.

[Section partition] The 2nd partition of the 3rd section.

[Date of issue] September 4, Heisei 13 (2001. 9.4)

[Publication No.] JP.6-256280.A.

[Date of Publication] September 13, Heisei 6 (1994. 9.13)

[\*\*\*\* format] Open patent official report 6-2563.

[Filing Number] Japanese Patent Application No. 5-286864.

[The 7th edition of International Patent Classification]

C07C 237/26

A61K 31/65 ADA

ADP .

AED .

AGZ .

[FI]

C07C 237/26

A61K 31/65 ADA

ADP .

AED .

AGZ .

[Procedure revision]

[Filing Date] November 15, Heisei 12 (2000. 11.15)

[Procedure amendment 1]

[Document to be Amended] Specification.

[Item(s) to be Amended] Claim.

[Method of Amendment] Change.

[Proposed Amendment]

[Claim(s)]

[Claim 1] The medicine which is a medicine for medical treatment of the mammalian which has the obstacle which has relation in the crosslinking bond of the collagen of an excessive amount, and contains the tetracycline of sufficient effective dose to check the crosslinking bond of the collagen of this excessive amount.

[Claim 2] The medicine according to claim 1 with which an obstacle contains diabetes, a scleroderma, and a progeria.

[Claim 3] The medicine according to claim 1 whose tetracycline is a daisy methylamino tetracycline.

[Claim 4] A daisy methylamino tetracycline 4-daisy methylamino tetracycline, A 4-daisy methylamino-5-oxytetracycline, a 4-daisy methylamino-7-chlorotetracycline, A 4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, 5a, a 6-anhydro-4-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6alpha-deoxy-5-hydroxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 6-Demeter-6-deoxy-4-daisy methylamino tetracycline, A 4-daisy methylamino-12a-deoxy tetracycline and 4 - Medicine according to claim 3 chosen from the group which consists of a daisy methylamino-11-hydroxy-12a-deoxy tetracycline.

[Claim 5] The medicine according to claim 1 chosen from the group which a tetracycline becomes from 2-NITORIRO analog of a 6a-benzyl thio methylene tetracycline and a tetracycline, the Monod N-alkylation amide of a tetracycline, a 6-fluoro-6-Demeter tetracycline, a 11a-chlorotetracycline, a 12a-deoxy tetracycline, and its derivative.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-256280

(43) 公開日 平成6年(1994)9月13日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 237/26		7106-4H		
A 6 1 K 31/65	ADA			
	ADP	7431-4C		
	AED			
	AGZ			
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁)				

(21) 出願番号	特願平5-286864	(71) 出願人	583090673 ザ リサーチ ファウンデーション オブ ステイト ユニヴァーシティ オブ ニ ューヨーク アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12246 アルバニ ステイト ユニヴァーシティ プラザ (番地なし)
(22) 出願日	平成5年(1993)11月16日	(72) 発明者	ローン エム ゴーループ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11787 スミスタウン ウィットニー ゲート 29
(31) 優先権主張番号	0 7 / 9 7 7 5 4 9	(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外 6 名)
(32) 優先日	1992年11月17日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 糖尿病における過度のコラーゲン架橋結合を阻害する非抗阻性化学修飾テトラサイクリンを含む  
テトラサイクリン

(57) 【要約】

【構成】 過剰量のコラーゲンの架橋結合に関連のある  
障害を有する哺乳動物の治療方法であって、該過剰量  
のコラーゲンの架橋結合を阻害するのに十分な有効量  
のテトラサイクリンを哺乳動物に投与することを含む  
上記方法。

【効果】 本発明の方法により、皮膚の硬さの増加、  
肺の弾性の減少、動脈血管の硬さの増加、関節移動  
の限定、創傷癒合の減少、蛋白症を含む腎障害の  
ような糖尿病に関連のある多くの合併症を改善される。

(2)

特開平6-256280

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 過剰量のコラーゲンの架橋結合に関連のある障害を有する哺乳動物の治療方法であって、該過剰量のコラーゲンの架橋結合を阻害するのに十分な有効量のテトラサイクリンを哺乳動物に投与することを含む上記方法。

【請求項2】 請求項1の方法であって、病理的に過剰量のコラーゲンの架橋結合が糖尿病、強皮症および早老症を含む障害に関連がある場合の方法。

【請求項3】 請求項1による方法であって、テトラサイクリンがデジメチルアミノテトラサイクリンである方法。

【請求項4】 請求項3による方法であって、デジメチルアミノテトラサイクリンが4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-5-オキシテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-7-クロロテトラサイクリン、4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、5a、6-アンヒドロ-4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6 $\alpha$ -デオキシ-5-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6-デメチル-6-デオキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-12a-デオキシテトラサイクリンおよび4-デジメチルアミノ-11-ヒドロキシ-12a-デオキシテトラサイクリンからなる群から選ばれる方法。

【請求項5】 請求項1による方法であって、テトラサイクリンが6a-ベンジルチオメチレンテトラサイクリン、テトラサイクリンの2-ニトリロアナログ、テトラサイクリンのモノ-N-アルキル化アミド、6-フルオロ-6-デメチルテトラサイクリン、11a-クロロテトラサイクリンおよび12a-デオキシテトラサイクリンおよびその誘導体からなる群から選ばれる方法。

【請求項6】 請求項1による方法であって、非抗菌性テトラサイクリンが1日当たり約0.5mg/kgから1日当たり約50.0mg/kgという量で投与される方法。

【請求項7】 請求項6による方法であって、非抗菌性テトラサイクリンが1日当たり約1.0mg/kgから1日当たり約15.0mg/kgという量で投与される方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、国立歯学研究機関によって授与されたR37 DE-03987の下に政府の支持とともになされた。本発明は、抗菌的には有効ではないが過度のコラーゲン架橋結合を阻害するには有効である量および/又は型のテトラサイクリンを哺乳動物に投与することによる、過剰量のコラーゲン架橋結合に関連のある障害を有する哺乳動物の治療方法に関する。過剰量のコラーゲン架橋結合に関連がある障害には糖尿病、

強皮症 (scleroderma) および早老症 (progeria) が含まれる。

【0002】

【従来技術】 真性糖尿病 (糖尿病) は数億の人間がかかっている複雑な病気である。糖尿病は血中におけるグルコース濃度の上昇に特徴がある。グルコースは利用されるべく体の細胞の中に入ることはできず、それゆえ血中に高濃度で存在する。血中グルコース濃度が尿道管の再吸収能を超過すると、グルコースは尿中に排出される。

糖尿病は衰弱させ生命に危険を及ぼす多数の合併症をもたらす。歯肉および皮膚における病理的に過度のコラーゲン活性というようなコラーゲン代謝における糖尿病誘発性の異常は文献に多数報告されている。Ramamurthy et al., *J. Periodontol. Res.* 17: 455-462 (1983); Ramamurthy et al., *Gerodontology* 2(1): 15-19 (1983)。過度のコラーゲン活性の合併症は通常は激しい歯周破壊であり、糖尿病に関連がある場合が多い。Finestone et al., *Diabetes* 16: 336-340 (1967)。この合併症は病気が十分に制御できない場合に特に問題となる。Amano et al., *J. Clin. Periodontol.* 17: 22-28 (1990)。

【0003】 糖尿病の結合組織におけるコラーゲン代謝の特徴的な異常は、冷 (0~4℃) 中性塩溶液または希酸溶液のいずれかにおけるコラーゲンの抽出性または溶解性の減少である。このコラーゲンの溶解性の減少は、コラーゲン分子と間におよび内在分子の共有結合による過度の架橋結合を反映している。コラーゲンの過度の架橋結合による糖尿病誘発性のコラーゲンの溶解性の減少は、皮膚、骨、腕、歯肉および大動脈を含む (これらに限定されはしないが) 種々の組織において見られる。Ramamurthy et al., *Gerodontology* 2: 15 (1983); Brownlee et al., *Science* 232: 1629 (1986); Buckingham et al., *J. Clin. Invest.* 86: 1046 (1990); Dominiczka et al., *Diabetes Care* 13: 468 (1990); Golub et al., *Biochim. Biophys. Acta* 534: 73 (1978)。コラーゲンの異常な低溶解性は細胞外マトリックスにおけるコラーゲンの過度の架橋結合を反映しており、これによりコラーゲンは過度に重合化して分解および物質交代に対してより抵抗性を有するようになるのである (論評としてGolub et al., *Biochim. Biophys. Acta* 534: 73 (1978) を参照)。

【0004】 Hamlin et al., *Diabetes* 24: 902 (1975) には、コラーゲン代謝における「老齢化類似 (aging-like)」異常として糖尿病患者の結合組織を特徴付けるこのコラーゲンの溶解性の減少とコラーゲンの架橋結合の増加を記載している。この異常は、皮膚の硬さの増加、関節移動の限定、動脈血管の硬さの増加、創傷癒合の減少、肺の弾性の減少および蛋白症を含有する腎障害を含む (これらに限定されはしないが) 糖尿病の莫大な合併症の主要な原因であるとますます考えられている。最近の研究 (Walton et al., *Biochim. Biophys. Acta*,



(3)

特開平6-256280

3

1138: 172-183 (1992))により、腎糸球体の基底膜 (IV型コラーゲン) の架橋結合が基底膜の蛋白質に対する浸透性を増加させ、次に糖尿病患者における腎障害の古典的なパラメーターである蛋白尿が促進されることが証明された。より以前に議論されたように、真性糖尿病はコラーゲンを含むタンパク質の架橋結合の増加をもたらす。

Cohen et al., (Biochem. Biophys. Res. Commun., 95: 765-769 (1980))はラットにおける誘発性糖尿病によって糸球体基底膜の非酵素的グリコシル化が増加することを見つけた。非酵素的グリコシル化は過度のコラーゲン架橋結合のための一つの機構を提供する。Reiser, Proc. Soc. Experiment. Biol. and Med., 196:17-29 (1991)。

【0005】コラーゲン生成は伸長的な翻訳後の修飾に特徴がある複雑な過程である。Jackson, The Substrate Collagen, Chapter 1, in: "Collagenase In Normal And Pathological Connective Tissues," (eds: D.E. Wooley and J.M. Evanson), pp 1-10, John Wiley & Sons Ltd., N.Y., 1980。コラーゲンの架橋結合は二つの異なる生化学的経路、すなわち酵素的リジロキシダーゼ依存性架橋結合と非酵素的グルコース由来コラーゲン架橋結合から生じる。Buckingham et al., J. Clin. Invest., 86: 1046 (1990)。プロコラーゲン (コラーゲン前駆体) 分子が細胞から分泌される前の細胞内の事象には、一定のリジンおよびプロリン残基の水酸化とヒドロキシリジンの酵素的仲介グリコシル化が含まれる。C末端およびN末端伸長ペプチドは順番に切り取られる。コラーゲン分子は酵素的リジロキシダーゼによって最初に仲介される共有架橋結合によって、繊維整列または網状組織中で安定になる。一定のリジンおよびヒドロキシリジン残基の非酵素的グリコシル化もまた細胞外マトリックス中で生じる。この修飾は、グリコシル化された残基の次の反応の結果生じる間接的な影響とともにコラーゲンの構造と機能に直接的な影響を及ぼすように見える。

【0006】糖尿病におけるコラーゲン架橋結合の増加は両方の機構によって仲介される。すなわち架橋結合はリジロキシダーゼの過度の活性によって酵素的に、血中および組織の液体グルコース濃度の上昇に直面することによるグルコース由来の機構によって非酵素的に仲介される。Makita et al., New Engl. J. Med., 325: 836 (1991); Cerami et al., Diabetes Care 11 (Suppl. 1: 73) (1988)。酵素的リジロキシダーゼ依存性コラーゲン架橋結合は一定のリジンおよびヒドロキシリジン残基のリジロキシダーゼ依存性酸化的脱アミノ化とともに開始する。生ずるアルデヒド体はリジン、ヒドロキシリジンおよびヒスチジン残基とさなる反応を経て、二重、三重および四重橋の架橋結合を形成する。Robbins, Methods Biochem. Analysis 28: 330-379 (1982)。特に、リジロキシダーゼはコラーゲン分子の非らせん領域における一定のリジンおよびヒドロキシリジン残基のε-

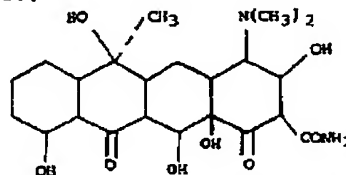
4

アミノ基をアルデヒド体に転換し、それからこのアルデヒド体が隣位の分子と Schiff 塩基架橋結合を形成するのである。Vader, et al., Biochem. J. 180: 639-645 (1979)。

【0007】前記したように、非酵素的グルコース由来架橋結合は細胞外マトリックス中のコラーゲン分子上のリジンおよびヒドロキシリジン残基の非酵素的グリコシル化とともに開始する。これらの初期のグリコシル化産物は一連の反応を経て、進行メイラード (Maillard) 産物または進行グリコシル化最終産物 (AGES) と総称される複雑なフルオロフォアおよびクロモフォアを形成すると考えられている。Brownlee et al., N. Engl. J. Med., 318: 1315-1322 (1988)。Brownlee et al., Science 232: 1629-1632 (1986) はアミノグアニジンがラットの糖尿病に関連がある非酵素的グルコース由来コラーゲン架橋結合の有効な阻害剤であることを報告している。しかしながら、アミノグアニジンはヒトへの使用は承認されていない。一方、テトラサイクリンはヒトへの使用は承認されている。

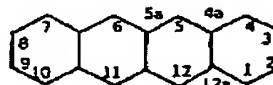
【0008】化合物テトラサイクリンは次の一般構造式を有する。

【化1】



【0009】環を構成する原子の番号は次の通りである。

【化2】



【0010】テトラサイクリンは5-OH誘導体 (テラマイシン) および7-C1誘導体 (オーレオマイシン) と同様に天然に存在し、抗生物質としてよく知られている。天然テトラサイクリンは構造中の一定の原子は保持していなければならないが、抗生物質特性を失わずに修飾をうけることができる。基礎となるテトラサイクリンの構造に対して可能な修飾そして不可能な修飾に関しては、The Chemistry of Tetracyclines, Chapter 6, Marcel Dekker, Publisher, N.Y. (1978) において、Mitscherによって論じられている。Mitscherによると、テトラサイクリン環構造の5~9位の置換基は修飾されても抗生物質特性を完全に

(4)

特開平6-256280

5

6

消失するわけではない。しかしながら、基礎となる環境適に対する変化または1~4位および10~12位の置換基の置換があると、実質的により少ない抗菌活性でまた有効な抗菌活性を有しない合成テトラサイクリンが一般的に得られる。例えば、4-デジメチルアミノテトラサイクリンは普通非抗菌性テトラサイクリンであるとみなされている。

【0011】テトラサイクリン系抗生物質の使用は、有効である一方、好ましくない副作用をもたらすことがある。例えば、抗生物質テトラサイクリンを長期間投与すると、腸寄生虫のような健様の寄生虫を減少または衰退させることがあり、抗生物質耐性菌の産生や日和見性の酵母や菌類の過剰生育を誘発することがある。これらの抗生物質特性に加えて、テトラサイクリンは多数の使用法について記載されている。例えば、テトラサイクリンは哺乳類のコラーゲナーゼ、セラチナーゼ、マクロファージエラスターゼおよび細菌のコラーゲナーゼのようなコラーゲン分解性酵素の活性を阻害することも知られている。Golub et al., *J. Periodont. Res.* 20: 12-23 (1985); Golub et al., *Crit. Revs. Oral Biol. Med.* 2: 297-322 (1991)。

【0012】テトラサイクリンは、抗菌のレベルおよび非抗菌のレベルのどちらかで投与されても、コラーゲンの分解と同様にコラーゲナーゼおよび他のコラーゲン分解性酵素の活性を減少させる役割を果たすことが知られている：米国特許第4,666,897号、4,704,383号、4,935,411号、4,935,412号。さらに、テトラサイクリンは哺乳類の骨格筋の衰弱とタンパク質の分解を阻害することが知られている：米国特許第5,045,538号。さらに、テトラサイクリンは骨粗鬆症において骨の形成を促進することが証明された：米国特許第4,925,833号。McNamara et al., への米国特許第4,704,383号には、有効な抗菌活性を実質的に有しないテトラサイクリンがラットにおけるコラーゲン分解性酵素の活性を阻害することが記載されている。McNamara et al. は非抗菌性テトラサイクリンが器官培養において骨吸収を減少させることも報告している。以前には、Golub et al. への米国特許第4,666,897号に、商業的に入手可能な抗菌的形態の薬剤を含む一般のテトラサイクリンが哺乳動物のコラーゲン分解性酵素の過剰の活性を阻害し、その結果、骨吸収中に生じるものを含む結合組織の分解を減少させるということが開示されている。

【0013】非抗菌性テトラサイクリンを含むテトラサイクリンが、ラットの関節炎の治療に有効であるという提案が多数ある。例えば、以下を参照：Golub et al., "Tetracyclines (TCs) Inhibit Matrix Metalloproteinases (MMPs): In Vivo Effects in Arthritic and Diabetic Rats And New In Vitro Studies," *Matrix*, Suppl. N o. 1: 315-316 (1992); Greenwald et al., "GMT, A Mat

rix Metalloproteinase Inhibitor, Prevents Bone Resorption In Adjuvant Arthritis." *Arthritis Rheum.* 34(9 suppl): S66 (abstract #A6), abstract presented at 55th Annual Meeting, Amer. College of Rheumatology, Boston MA, 1991年11月18日; Breedveld, "Suppression of Collagen And Adjuvant Arthritis By A Tetracycline," Northeastern Regional Meeting of The Amer. Rheum. Assoc., Atlantic City, New Jersey, 1987年10月23日。骨の損失に及ぼす非抗菌性テトラサイクリンの影響に関する関連文献としては Sipos et al., "The Effect of Collagenase Inhibitors On Alveolar Bone Loss Due To Periodontal Disease In Desalivated Rats," abstract presented at Matrix Metalloproteinase Conference, Destin, Florida, 1989年9月11~15日を参照された。

【0014】White, *Lancet*, April 29, p.966 (1989)によると、テトラサイクリンモノサイクリンは、過度のコラーゲナーゼに関連があると考えられる生命に危険のある皮膚障害であるジストロフィー性表皮水疱症の治療に有効である。皮膚障害におけるテトラサイクリンの有効性は Elewski et al., *Journal of*

*the American Academy of Dermatology* 8: 807-812 (1983)によっても研究されている。Elewski et al. はテトラサイクリン抗生物質が皮膚において抗炎症活性を有するということを開示し、座瘡のような細菌に関連のある皮膚疾患における治療効果の一部分は直接の抗菌効果よりはむしろ細菌誘発性炎症の阻害によるものであろうと推測している。同様に、Plewig et al., *Journal of Investigative Dermatology* 65: 352-352 (1975)は、抗生物質が炎症性皮膚疾患の治療に有効であるという仮説を確かめるために設計した実験を開示している。Plewig et al. の実験により、テトラサイクリンがヨウ化カリウムを張り当てることによって誘発された膿瘍の治療において抗炎症的特性を有することが確かめられる。

【0015】尋常性座瘡が原因で引き起こる炎症性皮膚疾患の治療において、非ステロイド性抗炎症剤との組合せてテトラサイクリンを使用することが研究されている。Wonget al., *Journal of American Academy of Dermatology* 11: 1076-1081 (1984)はテトラサイクリンとイブプロフェンの組合せを研究し、テトラサイクリンが尋常性座瘡に対して有効である一方、イブプロフェンがシクロオキシゲナーゼの阻害によって生じる炎症を軽減するのに有用であることを見つけた。Funt, *Journal of the American Academy of Dermatology* 13: 524-525 (1985)には、抗菌投薬量のモノサイクリンとイブプロフェンを組合せることによる同様の結果が開示されている。以上に基づきテトラサイクリンは異なる治療において有効であることがわかった。しかしながら、テトラサイクリンが過度のコラーゲン架橋結合の徴候や症状を改善することができるという提案は全く存在しない。さら

(5)

特開平6-256280

7

に、テトラサイクリンは糖尿病に関連のある高血糖の発病度の軽減に対して有意な影響を与えないことが分かっている。Golub et al., *J. Periodontal Res.*, 18:516-526 (1983); Golub et al., *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 68: 27-40 (1990); Yu et al., *J. Periodontal Res.*, 発行用提出 (1992)。

【0016】一方、インスリンはテトラサイクリンとは異なり、高血糖の発病度の軽減を含めて、糖尿病の症状の治療に有用である。しかしながらインスリンの治療をうけた糖尿病患者の大部分は、依然として過度のコラーゲン架橋結合を最終的には導くようなある程度の高血糖を有している。高血糖から生ずる過度のコラーゲン架橋結合の主要な原因が、酵素的リジロキシダーゼ依存性コラーゲン架橋結合であるのか非酵素的グルコース由来コラーゲン架橋結合であるのかどちらの機構であるのかは明確ではない。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は過度のコラーゲン架橋結合を治療するための手段を提供することを意図する。本発明により、抗菌効力を失った化学修飾されたアナログを含むテトラサイクリンが新規で新しい用途を有することが証明され、糖尿病の結合組織において過度のコラーゲン架橋結合を阻害する能力を有することが証明される。テトラサイクリンのこの抗菌特性は糖尿病誘発性腎障害（生命に危険のある疾患合併症）の徴候である蛋白尿の改善を含む糖尿病の重い合併症を軽減する。本発明は糖尿病、強皮症および早老症に関連のある過剰なコラーゲン架橋結合を病んでいる哺乳動物の治療方法を提供する。本発明の方法は、抗菌的には有効ではないが過剰なコラーゲン架橋結合を有効に阻害する薬および/又は型のテトラサイクリンを哺乳動物に投与することを含む。例えばデジメチルアミノテトラサイクリンのような化学修飾したテトラサイクリンは本発明において有用である。デジメチルアミノテトラサイクリンには4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-5-オキシテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-7-クロロテトラサイクリン、4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、5a、6-アンヒドロ-4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6 $\alpha$ -デオキシ-5-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6-デメチル-6-デオキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-12a-デオキシテトラサイクリンおよび4-デジメチルアミノ-11-ヒドロキシ-12a-デオキシテトラサイクリンが含まれる。

【0018】さらに本発明において有用である化学修飾したテトラサイクリンの例としては6a-ベンジルチオメチレンテトラサイクリン、テトラサイクリンの2-エトリオアナログ、テトラサイクリンのモノ-N-アルキル化アミド、6-フルオロ-6-デメチルテトラサイク

8

リン、11a-クロロテトラサイクリンおよび12a-デオキシテトラサイクリンおよびその誘導体がある。非抗菌性テトラサイクリンは1日当たり約0.5mg/kgから1日当たり約50.0mg/kgの量、好ましくは1日当たり約1.0mg/kgから1日当たり約15.0mg/kgの量で投与される。本発明の方法は例えば皮膚の硬さの増加、肺の弾性の減少、動脈血管の硬さの増加、関節移動の限定、創傷癒合の減少、蛋白尿をもたらす腎障害というような糖尿病に関連のある多くの合併症を改善する。本発明のよりよい理解のために、以下の記述に対して図面とともに言及がなされ、本発明の範囲は添付した特許請求の範囲の中で示される。

【0019】

【課題を解決するための手段】テトラサイクリンが糖尿病、強皮症および早老症に関連のある過度のコラーゲン架橋結合を阻害することが見つかった。特に、発明者らは一定のテトラサイクリンの使用が過度のコラーゲンの架橋結合を阻害することを見つけた。種々のテトラサイクリンが血中グルコース濃度に影響を及ぼすことが示された。本発明のテトラサイクリンは抗コラーゲン架橋結合効果を明確に証明した。本発明のテトラサイクリンは、糖尿病の治療において血中グルコース濃度を変えることが知られているインスリン治療と組み合わせることができる。テトラサイクリンが過度のコラーゲン架橋結合を阻害するのに対し、インスリンは高血糖の調節を計るものである。先に述べたように、過度のコラーゲン架橋結合に関連のある糖尿病の合併症には、皮膚の硬さの増加、肺の弾性の減少、動脈血管の硬さの増加、関節移動の限定、創傷癒合の減少および蛋白尿をもたらす腎障害が含まれる。

【0020】過度のコラーゲン架橋結合の阻害の効果はタンパク質のグリコシル化を減少するというテトラサイクリンの予期せぬ効果と関連がある。どれか一つの理論に束縛されることは望まないけれども、病理的に過度のコラーゲン架橋結合に対するこの阻害効果は、非酵素的グルコース由来コラーゲン架橋結合を減少させそして酵素的リジロキシダーゼ依存性コラーゲン架橋結合をも減少させるというテトラサイクリンの予期せぬ能力に関連があると考えられる。本発明によって治療される障害は哺乳動物において生じるものである。哺乳動物には、例えばヒトおよびマウスおよびラットのような実験動物が含まれる。本発明において有用であるテトラサイクリンは、哺乳動物において事実上非抗菌的である投薬量で哺乳動物に投与される任意のテトラサイクリンである。好ましくは、テトラサイクリンは抗菌特性を減少するように修飾をうける。テトラサイクリンの抗菌特性を減少させる方法は、*The Chemistry of the Tetracycline s*, Chapter 6, Mitscher, Marcel Dekker, Publisher s, N.Y. (1978)の211頁に記載されている。Mitscherによって指摘されているように、1、2、3、4、10

(6)

特開平6-256280

9

10

および12a位における修飾は生物活性の損失をもたらす。非抗菌性テトラサイクリンが好ましいのは、同じ投与量において抗菌性テトラサイクリンよりもより少ない副作用をもたらすような治療の水準で使用することができるからである。

【0021】好ましいテトラサイクリンは4位のジメチルアミノ基を欠くものである。そのような化学修飾されたテトラサイクリンには例えば、4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-5-オキシテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-7-クロロテトラサイクリン、4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、5a、6-アンヒドロ-4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6-デメチル-6-デオキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6α-デオキシ-5-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-11-ヒドロキシ-12a-デオキシテトラサイクリンおよび4-デジメチルアミノ-12a-デオキシテトラサイクリンおよびその誘導体が含まれる。例えばテトラサイクリンニトリルのようなニトリルを作るために2位の炭素で変更を受けたテトラサイクリンは非経口経路で投与される場合、抗コラーゲン架橋結合特性を示す非抗菌剤として有用である。

【0022】抗菌活性の減少のために修飾したテトラサイクリンのさらなる例には、6a-ベンジルチオメチレンテトラサイクリン、テトラサイクリンのモノ-N-アルキル化アミド、6-フルオロ-6-デメチルテトラサイクリン、11a-クロロテトラサイクリンおよび12a-デオキシテトラサイクリンおよびその誘導体が含まれる。テトラサイクリンの有効量とは過度のコラーゲン架橋結合を有効に阻害する量である一方、抗菌的には有効ではない量である。テトラサイクリンが過度のコラーゲン架橋結合を有意に減少させる量で存在するならば、本発明の目的の通り過度のコラーゲン架橋結合を有効に阻害する。過度のコラーゲン架橋結合は同年齢の非糖尿病対称の結合組織において見られるものより大きいコラーゲンの架橋結合と定義される (Hamlin et al., *Diabetes* 24: 902 (1975)参照)。

【0023】テトラサイクリンはもし微生物の成長を有意に阻害しなければ、事実上非抗菌的であるとみなされる。もちろんこれはテトラサイクリンの型、病気の状態および微生物の型というような多数の因子に依存して変化する。ヒト用の最大有効投与量とは有害な副作用を引き起こさない投与量の中での最大量をいう。例えば本発明の目的の場合、臨床的に有意な抗菌活性は毒性効果と同様に副作用に含まれる。約50mg/kg/日以上での投与量はヒトを含む大部分の哺乳動物において副作用をもたらす。本発明の非抗菌性テトラサイクリンは約0.5mg/kg/日から約50.0mg/kg/日、好ましくは約1.0mg/kg/日から約15.0mg/kg/

g/日の量で投与される。薬学的に許容できる担体とテトラサイクリンの配合の手段は、カプセル、圧縮錠剤、丸薬、溶液または懸濁液を含む多様な形態がある。注入および他の選択手段による経口または局所投与に好適な担体が含まれると考えられる。

【0024】

【実施例】以下の実施例は発明のさらなる理解を与えるのに役立つが、いかなる点においても発明の有効範囲を制限することは意味されない。

## 実施例 1

24頭の成熟雄Sprague-Dawleyラットを計量し(350~375gの体重)、0.9%食塩水(非糖尿病対称、ND C)または糖尿病を誘発するためのストレプトゾチン(体重1kg当たり75gのストレプトゾチン)を含む同じ溶液を末端静脈を通して注入した。糖尿病ラットを5個の実験群に分配し(群あたりn=4)。2%カルボキシメチルセルロース(CMC)中に懸濁した0.1、2、5又は10mgのCMT-1(4-デジメチルアミノテトラサイクリン、化学修飾した非抗菌性テトラサイクリン)をそれぞれ経口経路によって2日間毎日投与した。非糖尿病対称ラットは担体(2%CMC)だけを食餌した。尿中グルコース濃度はTes-Tape (Eli Lilly, Inc., Indianapolis, IN) で毎週測定した。

【0025】21日目に、ラットを計量しハロセイン(Halocarbon Laboratories)で麻酔をかけ、血液試料を血清グルコース(シグマグルコースオキシダーゼキット, St. Louis, MO)およびCMT-1の測定のために採取した。それからラットを放血によって殺し、胴全体からの皮膚を切り裂き、計量し、Schneier et al., *Diabetes* 31:426 (1982)に記載の通りに細分した。前述した技術(Golub et al., *J. Periodont. Res.* 12: 402(1977), Golub et al., *Biochim. Biophys. Acta* 534: 73 (1978))に多少の修正を加えて使用することによってコラーゲン溶解性について皮膚試料を調べた。指示がある箇所を除き、すべての処理は4℃で行った。簡単に言うと、中性塩-可溶性コラーゲンの調製のために、細分したラットの皮膚をトリス塩緩衝液(pH 7.4)で2日間抽出し、11、000×gで20分間遠心した。沈殿をさらに18時間抽出し、上記と同様に遠心した。次に両方の上清を混合し、3%酢酸に対して2日間完全に透析した。

【0026】酸-可溶性コラーゲンの調製のために、沈殿をさらに中性塩抽出用の記載と同様に3%酢酸で抽出した。中性塩および希酸抽出物を回転式蒸発乾燥機で減圧下60℃で乾燥した。不溶性コラーゲンの調製のために、蒸留水を残存するベレットに加え、圧力下121℃で15分間加熱し、それから前述したように真空乾燥する。酸加水分解の後に、2つの抽出物からの乾燥試料を中性塩-および酸-可溶性のコラーゲンの測定のために

(7)

特開平6-256280

11

12

使用する一方、沈殿を使用して不溶性コラーゲンの量を決定した。抽出およびラット血清中のCMT-1濃度のHPLCによる測定はYu et al., *Biochem. Med. & Metabolic Biol.* 47:10-20 (1992) に記載されている通りに行った。データについては統計分析を行った。平均値の標準偏差 (S. E. M.) を標準偏差から計算した。群の間の統計的有意さを分散の分析によって決定した一方、群の間の相違の有意さはTukey の試験によって決定した。

#### 【0027】結果

図1はストレプトゾトシン-糖尿病ラットの血中グルコース濃度 (mg/dl) に対するCMT-1の経口投薬量を変えた場合の影響をグラフで表したものである。各値は実験群当たり4頭のラットについての平均値±S. E. M. を表す。図1に示したように、ストレプトゾトシンによる糖尿病の誘発後3週間にラットは著しく高血糖になった。非糖尿病対称 (NDC群) および未処理糖\*

\* 尿病 (UD群) はそれぞれ  $95 \text{ mg/dl} \pm 3$  (S. E. M.) および  $787 \text{ mg/dl} \pm 10$  という血中グルコース濃度を示した ( $p < 0.01$ )。1~10mg/日の範囲の異なる経口投薬量のCMT-1で糖尿病ラットを治療しても高血糖の発病度を有意に変えることはなかった ( $p > 0.05$ )。血清CMT-1濃度はYu et al., *Biochem. Med. & Metabolic Biol.* 47: 10-20 (1992) に記載されているHPLC技術を使用して分析した。糖尿病ラットに経口投与する薬剤の投薬量を増加させると個々のラットの血清濃度は  $0.6 \mu\text{g/ml}$  (1mg 経口投薬量の場合) から  $6.5 \mu\text{g/ml}$  (10mg 経口投薬量の場合) まで増加することを結果は証明している (データは示されていない)。表1は異なる実験群の血清CMT-1濃度が平均値  $0.75 \mu\text{g/ml}$  (1mg 経口投薬量の場合) から  $5.8 \mu\text{g/ml}$  (10mg 経口投薬量の場合) まで増加すること示す。

#### 【0028】

10

表 1

ストレプトゾトシン-糖尿病ラットに対するCMT-1の投薬量を増加させて経口投与した場合の血清CMT-1濃度の結果

実験群	血清CMT-1濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
NDC	$0 \pm 0$
UD	$0 \pm 0$
D+1mg CMT/日	$0.75 \pm 0.04$
D+2mg CMT/日	$1.75 \pm 0.05$
D+5mg CMT/日	$3.90 \pm 0.16$
D+10mg CMT/日	$5.80 \pm 0.25$

各値は群当たり4頭のラットの平均値±S. E. M. を表す。

【0029】図2は糖尿病ラットの皮膚におけるコラーゲンの酸可溶画分に対するCMT-1治療の影響をグラフで表したものである。希酸 (4℃) におけるコラーゲンの溶解性は非糖尿病コントロール (NDC) ラットが100%になるように標準化され、未処理糖尿病 (UD) およびCMT-1処理糖尿病 (D+mg s CMT-1) の結果はNDC値に対する相対で表現されている。★は値がNDCとは有意に異なることを示す。 ( $p < 0.01$ )

図3は糖尿病ラットの皮膚におけるコラーゲンの塩可溶画分に対するCMT-1治療の影響をグラフで表したものである。中性塩 (4℃) におけるコラーゲンの溶解性は非糖尿病コントロール (NDC) ラットが100%になるように標準化され、未処理糖尿病 (UD) およびCMT-1処理糖尿病 (D+mg s CMT-1) の結果はNDC値に対する相対で表現されている。★は値がNDCとは有意に異なることを示す。 ( $p < 0.01$ )

図2および図3に示されたデータはそれぞれ、冷却した

(4℃) 希酸および中性塩溶液における皮膚コラーゲンの溶解性に対する糖尿病とCMT-1の経口投薬量の増加の影響を示す。予期した通り、組織中のコラーゲンの大半 (92~96%) はNDCおよび糖尿病ラットの両方の場合ともこれらの溶液に不溶であった (データは示されていない)。糖尿病を誘発すると、中性塩溶液および希酸溶液中の皮膚コラーゲンの溶解性はそれぞれ52%および56%減少した ( $p < 0.01$ )。コラーゲンの溶解性のデータは非糖尿病対称ラットの皮膚の塩可溶性および酸可溶性画分の場合が100%に標準化されていることに注意すべきである。糖尿病ラットに投与するCMT-1の経口投与量を連続的に増加させると、中性塩溶液における異常に低いコラーゲンの溶解性は10% (1mg CMT/日の投薬量の場合) から91% (10mg CMT/日の投薬量の場合) に増加し、希酸溶液におけるコラーゲンの低溶解性は18% (1mg/日の投薬量) から115% (10mg/日の投薬量) まで増加した。しかしながら、5および10mg/日という最大経口投薬量のCMT-1が糖尿病ラットに投与される場合のみ、非糖尿病対称ラットにおいて見られる

50

(8)

特開平6-256280

13

正常値に近いコラーゲン溶解性の値が得られた(図2および図3)。

【0030】CMT-1治療法は糖尿病結合組織におけるコラーゲンを特徴付ける過度の架橋結合を阻害することによって糖尿病の動物の皮膚におけるコラーゲンの性質を正常にした。表2に示したように、糖尿病ラットにミノサイクリン(CMT-1、4-デジメチルアミノテトラサイクリンは抗菌有効性を失ったテトラサイクリンのアナログである)と称される商業的に入手可能な抗菌性テトラサイクリンを経口投与した場合にも同様の影響が見られた。上述したように、正常ラットの皮膚におけ\*

14

\*るコラーゲンの大半は中性塩溶液および希酸溶液(4℃)において不溶であった。つまり皮膚のコラーゲンのうち5.8%および10.7%だけがそれぞれ1MのNaClおよび3%酢酸に溶解できた。ラットを糖尿病にした場合、コラーゲンの溶解性は特に希酸溶液中で減少し( $p < 0.05$ )、皮膚の不溶性コラーゲンの相対量は83.5%という正常の水準から糖尿病においては88.8%という異常に高い水準まで上昇した( $p < 0.05$ )。しかしながら、糖尿病をミノサイクリンで治療した場合、コラーゲンの溶解性は正常な水準に戻った。【0031】

表2  
糖尿病ラットでの中性塩溶液および希酸溶液(4℃)中の皮膚コラーゲンの溶解性:ミノサイクリン(Mino)の経口投与の影響

実験群	コラーゲン画分(%)		
	塩-可溶	酸-可溶	不溶
NDC	5.8±0.3	10.7±1.9	83.5±1.6
UD	4.5±0.6	6.7±0.2*	88.8±0.5*
D+20mg Mino/日	5.8±1.3	12.2±1.9	82.0±3.2

各値は群当たり3頭のラットの平均値±S. E. M.を表す。

# 他の2群とは有意に異なる( $p < 0.05$ )。

#### 【0032】実施例2

非糖尿病対称群、未処理ストレプトゾチン糖尿病群、および14週間にわたって2mg/ラット/日のデオキシサイクリンで経口的に処理したストレプトゾチン糖尿病群というラットの3群を確立した。14週の終わりに、血液試料を各ラットから採集し、ケトアミン架橋結合によってタンパク質に非酵素的に結合しフルクトサミンを形成するというグルコースの性質に基づく分析方法を使用して血清のグリコシル化タンパク質を測定した。分析中、ケトアミン結合によりアルカリ性条件下でテトラゾリウムが減少することによって色の変化が生じ、これを分光測光的に測定する。Ambruster, Clin. Chem., 33: 2153-2163 (1987)。フルクトサミン分析キットはIsolab Inc., Akron, Ohio 44321から入手可能である。血清試料は特に適心して脂質を除去した。透明な血清試料を試薬で処理してアスコルビン酸および他の妨げとなる基質を除去した。それから処理した血清試料をフルクトサミン-ピカルボネート試薬(テトラゾリウム塩)と\*

※もにインキュベートした。反応をHClの添加によって停止し、分光光度計で500nmの波長での吸収を測定した。データを統計的に分析した。

#### 【0033】結果

表3に示したように、慢性糖尿病(継続期間14週間)および慢性高血糖によって血清タンパク質中のフルクトサミン濃度は有意に( $p < 0.01$ )増加した。これらの結果は、病理的に過度のコラーゲン架橋結合を含む長期糖尿病の多くの医学的合併症の主要な原因であると広く考えられている反応である非酵素的グリコシル化の証拠を提供する。表3はさらに、糖尿病をドキシサイクリンで毎日治療した場合、糖尿病の血清タンパク質中のフルクトサミン濃度は有意に( $p < 0.05$ )減少したことを示す。これらの結果からテトラサイクリン(例えばドキシサイクリン)の投与が慢性糖尿病におけるタンパク質の非酵素的グリコシル化を阻害することが示唆される。しかしながら、これらの治療によっても糖尿病ラットの高血糖の発症度は緩和されない。Golub et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 68:27-40 (1990)。

#### 【0034】

表 3

ラットの実験群

血清フルクトサミン濃度  
(平均値±標準偏差)

非糖尿病対称  
未処理糖尿病

1.33±0.05  
3.82±0.17

(9)

特開平6-256280

15

16

ドキシサイクリン処理糖尿病

3. 23 ± 0. 20

## 【0035】実施例3

糖尿病ラットにおいて腎障害のパラメーターである蛋白尿に対するテトラサイクリン治療の影響を決定するために実施例3を行った。ストレプトゾトシン-糖尿病ラットを4週間にわたって20 mg/ラット/日のミノサイクリンを毎日経口投与して処理した。処理が終了したら、24時間分の尿を回収し、蛋白質の排泄量を測定した。

## 【0036】結果

図4に示したように、尿中への蛋白質の排泄量は正常（非糖尿病）ラットにおける48 mg/24時間から未処理糖尿病ラットにおける280 mg/24時間へと483%増加した。驚くべきことに、ミノサイクリンを毎日経口投与すると糖尿病ラットにおける蛋白尿の発生は完全に妨げられた。Walton et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1138:172-183 (1992)によると、この蛋白尿の妨害は過度のコラーゲン架橋結合を阻害するという本発明のテトラサイクリンの性質をさらに証明することになる。化学修飾した非抗菌性テトラサイクリン（CMT-1；4-デジメチルアミノテトラサイクリン）を使用する最近の実験により、糖尿病ラットにおける蛋白尿が減少することもわかった（データは示されていない）。Golub et al., *Matrix*, suppl 31: 315-316 (1992)。図4はミノサイクリンの処理によって尿蛋白質の排泄量が52 mg/24時間になったことを示す。ミノサイクリンおよびCMT-1のどちらの処理によっても、高血糖、糖尿および多尿を含む糖尿病の他の兆候は減少しなかつ

\*た。

【0037】抗菌型および非抗菌型の両方のテトラサイクリンを使用するこれらの実験結果から、明らかに加速した老化、および糖尿病の重い合併症の多くに関連があると広く考えられている異常である過度のコラーゲン架橋結合を妨げるための強力な新しい医学的アプローチが示される。このようにここでは発明の好ましい具体例の様であるとして現在考えられるものを記載したが、本発明の精神から離れることなく他のおおよびさらなる修正を行うことが可能であることは当業者に理解されるであろう。本発明は請求の範囲に述べられている発明の真の範囲内に入るようなすべての修正を含むものと意図される。

## 【図面の簡単な説明】

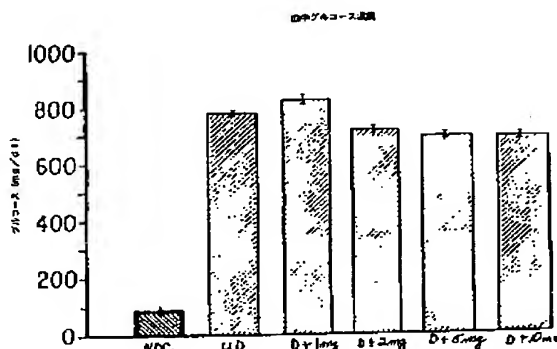
【図1】図1はストレプトゾトシン糖尿病ラットの血中グルコース濃度（mg/dl）に対するCMT-1の経口投与量を変えた場合の影響をグラフで表したものである。

【図2】図2は糖尿病ラットの皮膚におけるコラーゲンの腔可溶成分に対するCMT-1治療の影響をグラフで表したものである。

【図3】図3は糖尿病ラットの皮膚におけるコラーゲンの腔可溶成分に対するCMT-1治療の影響をグラフで表したものである。

【図4】図4は糖尿病ラットの尿排泄量と蛋白尿に対するミノサイクリン治療の影響をグラフで表したものである。

【図1】

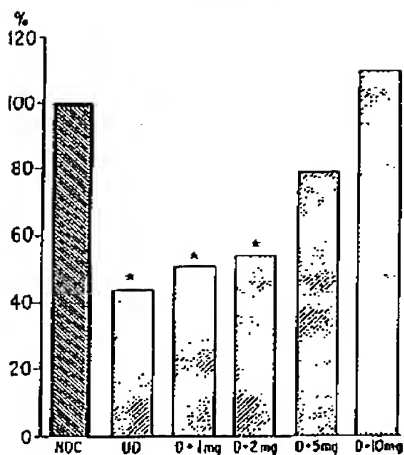


(10)

特開平6-256280

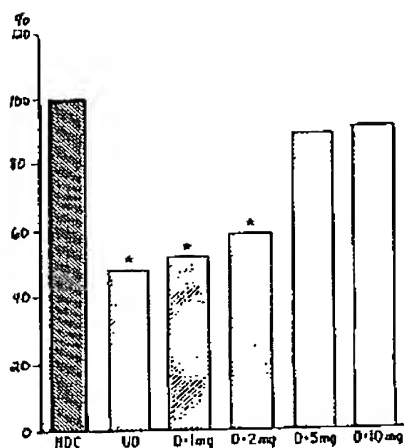
【図2】

血-可溶性コラーゲン  
(HDCに対する%として)



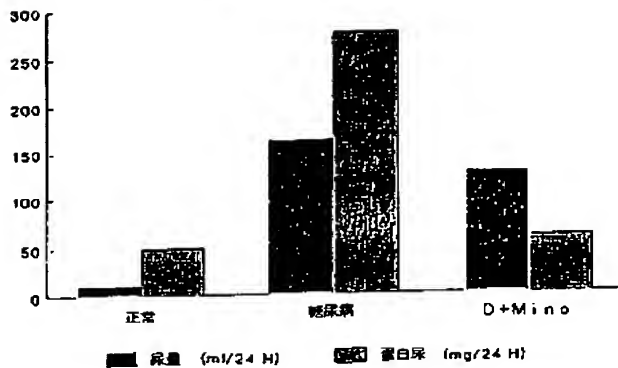
【図3】

血-可溶性コラーゲン  
(HDCに対する%として)



【図4】

テトラサイクリンTxは蛋白尿を減少する  
尿量と蛋白尿に対する影響





(11)

特開平6-256280

フロントページの続き

(72)発明者 トーマス エフ マックナマラ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11777  
ポート ジェファークソン ビーオーボッ  
クス 44

(72)発明者 ナンガヴァラム エス ラママーシー  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11787  
スミスタウン ライマン コート 10

特開平6-256280

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第2区分  
 【発行日】平成13年9月4日(2001.9.4)

【公開番号】特開平6-256280  
 【公開日】平成6年9月13日(1994.9.13)  
 【年通号数】公開特許公報6-2563  
 【出願番号】特願平5-286864  
 【国際特許分類第7版】

C07C 237/26  
 A61K 31/65 ADA  
 ADP  
 AED  
 AGZ

【F1】  
 C07C 237/26  
 A61K 31/65 ADA  
 ADP  
 AED  
 AGZ

## 【手続補正書】

【提出日】平成12年11月15日(2000.11.15)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】特許請求の範囲  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【特許請求の範囲】

【請求項1】 過剰量のコラーゲンの架橋結合に関連のある障害を有する哺乳動物の治療用薬剤であって、該過剰量のコラーゲンの架橋結合を阻害するのに十分な有効量のテトラサイクリンを含む薬剤。

【請求項2】 障害が糖尿病、強皮症および早老症を含む請求項1に記載の薬剤。

【請求項3】 テトラサイクリンがデジメチルアミノテトラサイクリンである、請求項1に記載の薬剤。

【請求項4】 デジメチルアミノテトラサイクリンが4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチル

アミノ-5-オキシテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-7-クロロテトラサイクリン、4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、5a-6-アンヒドロ-4-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6 $\alpha$ -デオキシ-5-ヒドロキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、6-デメチル-6-デオキシ-4-デジメチルアミノテトラサイクリン、4-デジメチルアミノ-12a-デオキシテトラサイクリンおよび4-デジメチルアミノ-11-ヒドロキシ-12a-デオキシテトラサイクリンからなる群から選ばれる、請求項3に記載の薬剤。

【請求項5】 テトラサイクリンが6a-ベンジルチオメチレンテトラサイクリン、テトラサイクリンの2-エトリロアナログ、テトラサイクリンのモノ-N-アルキル化アミド、6-フルオロ-6-デメチルテトラサイクリン、11a-クロロテトラサイクリンおよび12a-デオキシテトラサイクリンおよびその誘導体からなる群から選ばれる、請求項1に記載の薬剤。